

温岭高峰牛线粒体 DNA 全基因组遗传多样性分析

李 双¹, 夏小婷¹, 李付强², 陈宁博¹, 雷初朝^{1*}

(1. 西北农林科技大学动物科技学院, 陕西 杨凌 712100; 2. 湖南南天华实业有限公司, 湖南 涟源 417126)

摘 要: [目的] 通过测定温岭高峰牛线粒体 DNA 全基因组序列以分析温岭高峰牛的母系起源及遗传多样性。[方法] 采用 DNA 提取、测序及生物信息学方法。[结果] 通过对 19 头温岭高峰牛线粒体 DNA 全基因组序列分析, 共发现 263 个变异位点, 定义 9 种单倍型, 单倍型多样性 ($Hd \pm SD$) 为 0.778 ± 0.096 , 核苷酸多样性 ($Pi \pm SD$) 为 0.0017 ± 0.0014 , 表明温岭高峰牛的遗传多样性较低。构建的 NJ 系统发育树和单倍型进化网络图表明温岭高峰牛有普通牛和瘤牛 2 种母系起源。[结论] 温岭高峰牛线粒体 DNA 基因组的遗传多样性较低, 有瘤牛和普通牛两个母系起源, 但主要受瘤牛的影响。

关键词: 温岭高峰牛; 线粒体 DNA 基因组; 遗传多样性; 母系起源

中图分类号: S823

文献标识码: A

文章编号: 1001-9111(2022)02-0028-05

我国黄牛的品种资源十分丰富, 有 55 个地方黄牛品种资源^[1]。55 个地方黄牛品种分布地域广泛, 按地理分布不同, 分为北方黄牛、中原黄牛和南方黄牛 3 大类^[2]。关于中国黄牛的起源问题, 一直以来都存在不同的观点, 众多国内外学者从 Y 染色体分子遗传多态性及线粒体 DNA 多态性方面进行系统研究^[3-7], 证明北方黄牛主要受普通牛的影响, 南方黄牛主要受瘤牛的影响, 中原黄牛同时受到普通牛和瘤牛的影响, 表明我国黄牛为多元起源的, 表明中国黄牛具有普通牛和瘤牛两大母系起源。总体来看, 我国普通牛和瘤牛血统所占比例在地理分布上呈现明显的梯度变化趋势。

哺乳动物的线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 为闭合环状双链分子, 一般大小为 16.5 kb, 具有结构简单、遵循母系遗传、无重组、进化速度快等特点, 可以很好地反映家畜的母系起源。与其他哺乳动物一样, 牛的线粒体 DNA 同样由 37 个蛋白编码基因和一段 910 bp 的 D-loop 区组成^[12]。Xia 等^[6]系统分析了 57 个中国地方黄牛品种/群体共 1 105 个个体的线粒体 DNA D-loop 区的遗传多样性和母系起源, 发现中国地方黄牛有普通牛 T1a、T2、T3、T4、T5 和瘤牛 I1、I2 共 7 种单倍型组, 单倍

型多样性为 0.904 ± 0.008 , 表明中国地方黄牛的线粒体遗传多样性非常丰富。在普通牛单倍型组中, T2、T3 和 T4 是中国北方黄牛的主要单倍型组, 在瘤牛单倍型组中, I1 在中国南方黄牛中占主导地位, I2 只近分布在中国西南地区 (云贵高原和西藏) 和新疆地区。另外, 在西藏牛中检测到 8 个个体属于牦牛线粒体序列, 说明西藏牛与牦牛存在基因交流。目前有关黄牛 mtDNA 全基因组的研究不多。Xia 等^[7]分析了我国肉牛培育品种云岭牛 129 个个体的 mtDNA 全基因组遗传多样性和群体结构, 共检测到普通牛 T1、T2、T3、T4、T6 和瘤牛 I1、I2 共 7 种单倍型组, 表明云岭牛拥有丰富的线粒体遗传多样性。Xia 等^[8]分析了 170 个蒙古牛系统 10 个群体的线粒体基因组, 发现其拥有 T1、T2、T3、T4、I、Q、P 与牦牛的支系。

温岭高峰牛是我国南方地区的优良地方黄牛品种, 具有役力较强、遗传性稳定、适应性良好的特点^[9], 但随着经济发展, 温岭高峰牛的存栏量越来越少, 并于 2001 年被农业部列入国家级畜禽品种资源保护名录。同时温岭高峰牛也具有骨骼细致, 肌肉结实丰满的特点, 有向役肉兼用方向发展的良好基础, 因此在做好活畜保种的同时, 也可以开展杂交

收稿日期: 2021-12-02 修回日期: 2021-12-25

基金项目: 财政部和农业农村部——国家现代农业产业技术体系项目 (CARS-37)

作者简介: 李双 (2000—), 女, 硕士生, 主要从事动物遗传育种研究。

* 通讯作者: 雷初朝 (1968—), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事牛遗传资源研究。

改良工作^[10]。本研究对温岭高峰牛的线粒体DNA全基因组多态性进行分析,从母系遗传的角度鉴定温岭高峰牛的群体结构以及遗传多样性,为温岭高峰牛的保种和开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 样品采集

研究按照随机典型抽样方法,从浙江省温岭高峰牛保种场采集10头温岭高峰牛耳组织样本,所采集的每个样本都符合温岭高峰牛的品种特征,并根据家系信息尽量避开个体间的血缘关系。从GenBank下载9条温岭高峰牛全基因组序列(其登录号为:DRR295117-DRR295125)。同时从GenBank下载7条代表不同单倍型组的线粒体DNA全基因组序列以及1条牦牛线粒体DNA全基因组序列(GenBank号为:EU177841.1、AY676856.1、EU177839.1、AB074964.1、EU177862.1、EU177868.1、AF492350.1、AY684273.2)作为对照。

1.2 DNA提取与测序

用标准苯酚—氯仿法提取温岭高峰牛的基因组DNA,将检测质量良好的DNA送至北京诺禾致源生物信息科技有限公司,构建长度为350 bp左右的文库,利用Illumina HiSeq 2000 PE150的测序平台进行测序。

1.3 数据处理与统计方法

用Trimmomatic软件去除温岭高峰牛基因组中测序低质量和接头序列,用BWA-MEM(0.7.13-r1126)软件将过滤后质量合格的序列比对到最新参考基因组(ARS-UCD1.2)中的线粒体基因组上(GenBank:AY526085.1)。将BAM比对转换为FASTQ文件,然后使用Mapping Iterative Assembler v1.0(MIA, <https://github.com/mpieva/mapping-iterative-assembler>)组装温岭高峰牛的线粒体DNA基因组全序列。

使用DnaSPv 5.10软件对温岭高峰牛的线粒体DNA基因组序列进行分析,对温岭高峰牛的单倍型和变异位点的数量进行统计,并计算单倍型多样性(H_d)、核苷酸多样性(P_i)和平均核苷酸差异(k)。利用MEGA 5.0对温岭高峰牛的线粒体DNA基因组序列进行比对分析,之后进行人为校正,将GenBank上下载的7条具有代表性的线粒体DNA基因组序列(包括单倍型T1、T2、T3、T4、T5、I1、I2)以及1条牦牛线粒体DNA基因组序列作为对照,构建温岭高峰牛的NJ系统发育树。最后使用NETWORK

5.0.1.1软件构建温岭高峰牛单倍型的网络图。

2 结果与分析

2.1 温岭高峰牛线粒体DNA全基因组的序列特征

对19头温岭高峰牛的线粒体全基因组数据进行统计,其平均比率为99.91%,对比率范围为99.82%~99.97%;平均深度为861.70 x,深度范围为(362.25~2 184.86) x。温岭高峰牛线粒体DNA全基因组序列由A、T、G、C 4种碱基组成,其中A碱基含量最高(33.5%),其次为T(27.1%)和C(26.0%),G碱基含量最低,仅为13.4%。A+T的平均含量为60.6%,G+C的平均含量为39.4%。11头温岭高峰牛线粒体DNA基因组长度为16 338 bp,7头温岭高峰牛线粒体DNA基因组长度为16 339 bp,1头温岭高峰牛线粒体DNA基因组长度为16 340 bp,这种长度变化主要是插入和缺失导致的。在19头温岭高峰牛群体中共检测到263个变异位点,有258个单一多态位点,5个简约信息位点。258个单一多态位点均为两碱基突变,而5个简约信息位点中有4个为两碱基突变,1个为三碱基突变。

2.2 温岭高峰牛线粒体DNA全基因组遗传多样性和单倍型组成

研究分析了温岭高峰牛的线粒体DNA全基因组的序列变异,以评估其线粒体DNA遗传变异和母系起源。结果显示在19头温岭高峰牛中定义了9种单倍型,其中,有8个单倍型(共包含18个体,占94.74%)属于瘤牛,有1个单倍型(包含1个体,占5.36%)属于普通牛。温岭高峰牛单倍型多样性($H_d \pm SD$)为 0.778 ± 0.096 ,核苷酸多样性($P_i \pm SD$)为 0.0017 ± 0.0014 ,平均核苷酸差异(k)为28.327。

2.3 温岭高峰牛的NJ系统发育树

利用MEGA 5.0软件对19头温岭高峰牛线粒体DNA基因组序列组成的9个单倍型进行系统发育分析,以从GenBank下载的7条具有代表性的线粒体DNA基因组序列(T1、T2、T3、T4、T5、I1、I2)作为参考,以1条牦牛线粒体DNA基因组序列作为外群,构建温岭高峰牛的NJ系统发育树。从图1可以看出,NJ系统发育树将温岭高峰牛分为瘤牛和普通牛两大支系,8个瘤牛单倍型(包含18个体,占94.74%)属于I1单倍型组,仅有1个单倍型(包含1个体,占5.36%)属于普通牛支系,说明温岭高峰牛是普通牛与瘤牛的混合母系起源,主要受瘤牛的

影响。

2.4 构建温岭高峰牛单倍型的进化网络图

进化网络(network)是一种可以客观描述物种内不同单倍型间遗传进化关系的方法,其中 media-joining 进化网络可以快速地进行大量单倍型数据分析。本研究利用 Network 软件,以从 GenBank 下载的 7 条具有代表性的线粒体 DNA 基因组序列(T1、T2、T3、T4、T5、I1、I2)以及 1 条牦牛线粒体 DNA 基因组序列作为对照,构建了 19 头温岭高峰牛线粒体

DNA 全基因组 9 个单倍型间的 media-joining 进化网络。从图 2 可以看出,本文分析的 19 头温岭高峰牛均可划分到瘤牛和普通牛两个大的单倍型类群中,其中,8 个单倍型(包含 18 个体,占 94.74%)属于瘤牛支系,仅有 1 个单倍型(包含 1 个体,占 5.36%)属于普通牛支系,表明温岭高峰牛是普通牛与瘤牛的混合母系起源,但受瘤牛影响较大,与 NJ 系统发育树的结果一致。

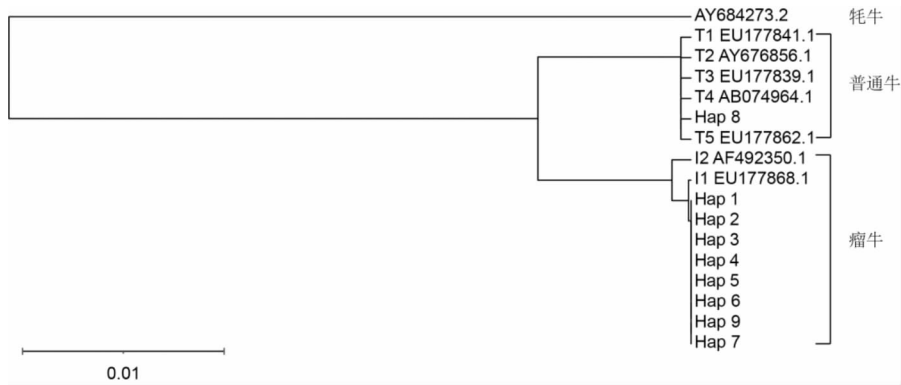
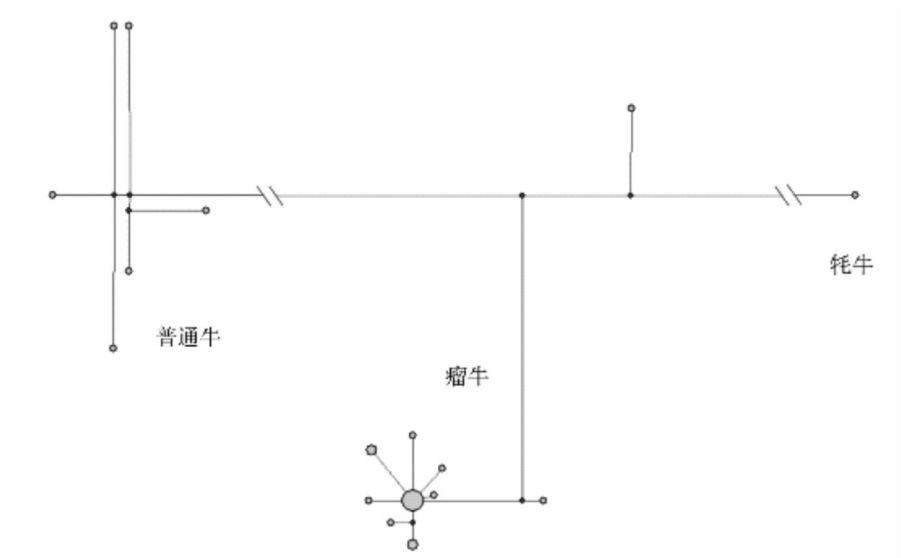


图 1 温岭高峰牛线粒体 DNA 基因组单倍型的 NJ 系统发育树



注:圆的面积与单倍型频率成正比,红点是中值向量。

图 2 温岭高峰牛 9 个线粒体 DNA 基因组单倍型的进化网络图

3 讨论

单倍型多样性(H_d)和核苷酸多样性(P_i)是衡量一个群体线粒体 DNA 变异程度的重要指标,单倍型多样度和核苷酸多样度的值越大,说明该群体的遗传多样性越高,反之,则说明该群体的遗传多样性越低。Xia 等^[7]分析了我国肉牛培育品种云岭牛的

mtDNA 全基因组遗传多样性,发现其 H_d 值为 0.964, P_i 值为 0.007 8。Xia 等^[8]分析了 170 个蒙古牛系统 10 个群体的线粒体基因组,发现其 H_d 值为 0.464 ~ 1.000, P_i 值为 0.000 4 ~ 0.009 2。本研究表明温岭高峰牛的 H_d 值为 0.778, P_i 值为 0.001 7,与 Xia 等^[7-8]的研究结果相比,其 mtDNA 基因组的遗传多样性较低,这可能与其群体数量大

大减少,处于保种状态有关。温岭高峰牛为役用品种,随着农村经济快速发展,其役用功能大都消失,农户已基本不养殖该品种,导致其群体数量急剧减少,难以进行血统更新,从而导致温岭高峰牛遗传多样性降低^[9-10]。本研究发现,在19个温岭高峰牛个体中,1个普通牛起源的个体(1/19,占5.26%)共享1个单倍型,18个瘤牛起源的个体(18/19,占94.74%)共享8个单倍型,表明温岭高峰牛主要受瘤牛的影响。Jia等^[11]对中国地方黄牛为主的亚洲六国黄牛 mtDNA D-loop 序列的多样性研究,其中12个温岭高峰牛全部属于瘤牛 II 单倍型组,没有普通牛单倍型。Jiang等^[12]对舟山黄牛和温岭高峰牛的全基因组研究,发现温岭高峰牛和舟山黄牛类似,以瘤牛为主,有少量普通牛的基因组渗入。从本研究的 mtDNA 基因组及全基因组研究均表明,温岭高峰牛以瘤牛血统为主,含有极少量普通牛基因组。孙婷等^[13]对吉安黄牛的 mtDNA 研究,表明南方地区的吉安黄牛,其母系起源受瘤牛的影响大。而对郟县红牛的 mtDNA 遗传多样性研究,发现郟县红牛是典型的中原黄牛,同时受到普通牛和瘤牛的影响^[14]。本研究发现温岭高峰牛线粒体 DNA 遗传多样性较低,具有普通牛和瘤牛两大母系起源,但主要受瘤牛的影响。由于温岭高峰牛的遗传多样性较低,在保种条件下更容易近亲繁殖,因此应该特别注意防止其近亲繁殖的问题,提高保种监测水平,保证其遗传资源不丢失,品种特性不改变。要将温岭高峰牛产业做大做强,除了保种外,还要想办法发掘其有利肉用性状,加快推进品种资源保护与有序的产业化开发,真正做到对温岭高峰牛品种资源的保护和开发利用。

4 结 论

本文共分析了19头温岭高峰牛的线粒体 DNA 全基因组序列,其中4种碱基的含量分别为:A(33.5%)、T(27.1%)、C(26.0%)、G(13.4%),A+T的含量明显高于G+C,表现出了对碱基的偏好性,这与一般多细胞动物线粒体 DNA 的显著特征相符^[15]。19头温岭高峰牛的单倍型多样性($Hd \pm SD$)为 0.778 ± 0.096 ,核苷酸多样性($Pi \pm SD$)为 0.0017 ± 0.0014 ,平均核苷酸差异(k)为28.327,与Xia等^[7-8]的研究结果相比,其线粒体 DNA 基因组的遗传多样性较低,这可能与温岭高峰牛由于役用功能基本消失而导致农户饲养数量不断减少,且难以进行血统更新有关,需要相关部门进一步加大保

种力度,从多方面对温岭高峰牛这一品种资源进行保护和开发利用。同时,在19头温岭高峰牛的线粒体 DNA 全基因组序列中发现了263个变异位点,共定义9种单倍型,从NJ系统发育树以及进化网络图均可以看出,有8个单倍型(共包含18个体,占94.74%)属于瘤牛支系且均为II支系,仅有1个单倍型(包含1个体,占5.36%)属于普通牛支系,因此温岭高峰牛具有瘤牛和普通牛两大母系起源,但受瘤牛影响更大。

参考文献:

- [1] 陈宁博,雷初朝.从DNA角度认识中国黄牛的起源和利用历史[J].第四纪研究,2022,42(1):92-100.
- [2] 《中国牛品种志》编写组.中国牛品种志[M].上海:上海科学技术出版社,1988.
- [3] LI R, ZHANG X M, CAMPANA M G, et al. Paternal origins of Chinese cattle[J]. Animal Genetics, 2013, 44(4): 446-449.
- [4] XIA X, YAO Y, LI C, et al. Genetic diversity of Chinese cattle revealed by Y-SNP and Y-STR markers[J]. Animal Genetics, 2019, 50(1): 64-69.
- [5] LEI C Z, CJEN H, ZHANG H C, et al. Origin and phylogeographical structure of Chinese cattle[J]. Animal Genetics, 2006, 37(6): 579-582.
- [6] XIA X, QU K, ZHANG G, et al. Comprehensive analysis of the mitochondrial DNA diversity in Chinese cattle[J]. Animal Genetics, 2019, 50(1): 70-73.
- [7] XIA X, QU K, LI F, et al. Abundant genetic diversity of Yunling cattle based on mitochondrial genome[J]. Animals, 2019, 9(9): 641.
- [8] XIA X T, ACHILLI A, LENSTRA J A, et al. Mitochondrial genomes from modern and ancient Turano-Mongolian cattle reveal an ancient diversity of taurine maternal lineages in East Asia[J]. Heredity, 2021, 126(6): 1000-1008.
- [9] 张新国,袁灵光.温岭高峰牛的保种现状和发展方向[J].浙江畜牧兽医,2004,29(6):20.
- [10] 章晓炜,刘莉君,马敏彪.浙江省地方牛品种特征和保种现状[J].浙江畜牧兽医,2019,44(2):26-27.
- [11] JIA S, ZHOU Y, LEI C, et al. A new insight into cattle's maternal origin in six Asian countries[J]. Journal of Genetics and Genomics, 2010, 37: 173-180.
- [12] JIANG L, KON T, CHEN C et al. Wholegenome sequencing of endangered Zhoushan cattle suggests its origin and the association of MC1R with black coat colour[J]. Scientific Reports, 2021, 11: 17359.
- [13] 孙婷,夏小婷,党瑞华,等.吉安牛 mtDNA D-loop 区遗传多样性研究[J].中国牛业科学,2018,44(2):1-3.
- [14] 许星龙,夏小婷,陈宁博,等.郟县红牛 mtDNA D-loop 区遗传多样性与母系起源研究[J].中国牛业科学,2021,47(5):21-23.
- [15] GACH M H, BROWN W M. Characteristics and distribution of large tandem duplications in Brook Stickleback (*Culaea Inconspans*) mitochondrial DNA[J]. Genetics, 1997, 145(2): 383.

Genetic Diversity of Mitochondrial DNA Genome of Wenling Humped Cattle

LI Shuang¹, XIA Xiao-ting¹, LI Fu-qiang², CHEN Ning-bo¹, LEI Chu-zhao^{1*}

(1. College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100;

2. Hunan Tianhua Industrial Corporation Ltd., Lianyuan, Hunan 417126)

Abstract: [Objective] Sequencing the whole genome sequence of mitochondrial DNA to understand the maternal origin and genetic diversity of Wenling humped cattle. [Method] DNA extraction and sequencing, and bioinformatics were used. [Result] 263 variation sites were found and 9 haplotypes were defined by analyzing the whole genome sequence of mitochondrial DNA of 19 Wenling humped cattle. The haplotype diversity ($Hd \pm SD$) was 0.778 ± 0.096 and nucleotide diversity ($Pi \pm SD$) was 0.0017 ± 0.0014 , which showed the low mitochondrial genetic diversity in Wenling humped cattle. NJ tree and haplotype network showed that the maternal origins of Wenling humped cattle were from *Bos taurus* and *Bos indicus*. [Conclusion] Wenling humped cattle has a low genetic diversity. Meanwhile, Wenling humped cattle had two types of maternal origins from *Bos taurus* and *Bos indicus* and were mainly affected by *Bos indicus*.

Key words: Wenling hump cattle; mitochondrial DNA genome; genetic diversity; maternal origin

(上接第27页)

- [17] 温方. 紫花苜蓿不同品种生产性能及其光合特性研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2007.
- [18] 萧运峰, 王锐, 高洁. 五节芒生态一生物学特性的研究[J]. 四川草原, 1995(1): 25-29.
- [19] 刘玉华. 紫花苜蓿生长发育及产量形成与气象条件关系的研究[D]. 陕西 杨凌: 西北农林科技大学, 2006.
- [20] 马绍楠, 许贵善, 崔凯, 等. 反刍动物常用饲料中 CF、NDF、ADF 的关联性分析[J]. 饲料工业, 2018, 39(21): 52-59.
- [21] 王永刚. 播期与刈割期对不同品种燕麦产量及品质的影响[D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学, 2019.
- [22] 陈艳, 王之盛, 张晓明, 等. 常用粗饲料营养成分和饲用价值分析[J]. 草业学报, 2015, 24(5): 117-125.
- [23] 贾存辉, 钱文熙, 吐尔逊阿依·赛买提, 等. 粗饲料营养价值指数及评定方法[J]. 草业科学, 2017, 34(2): 415-427.
- [24] 邹华围. 不同 ADF 水平日粮对南江黄羊瘤胃发酵和纤维降解菌的影响[D]. 成都: 四川农业大学, 2010.
- [25] 姚明久, 程明军, 何光武, 等. 9 个燕麦品种在成都平原的产量和营养品质分析[J]. 四川畜牧兽医, 2018, 45(1): 24-26.
- [26] 李岚捷, 成述儒, 刁其玉, 等. 日粮碳水化合物对幼龄反刍动物生长发育的影响[J]. 畜牧与兽医, 2017, 49(12): 145-149.

Growth Performance and Nutritional Value of Wild Bamao Grass in Anhui Province

JIN Hai, ZHAO Shuan-ping, XU Lei, JIA Yu-tang*

(Anhui Province Key Laboratory of Livestock and Poultry Product Safety Engineering, Institute of Animal Husbandry and

Veterinary Science of Anhui Academy of Agricultural Sciences, Hefei 230001)

Abstract: [Objective] The objective was to study the natural growth performance and nutritional value of wild bamao grass in Anhui province. [Method] This experiment was carried out in Anqing Taihu area from April to October 2020. The bamao grass was cut about every 30 days, and the yield, growth rate and conventional nutritional value of bamao grass were measured and analyzed. [Result] The results showed that the plant height of wild bamao grass was 152.80 ~ 174.80 cm. It could be cut once a year. The yield of fresh grass was 24.68 ~ 28.22 t/hm², hay was 6.85 ~ 11.10 t/hm², the growth rate was fast from April to July and the fastest was 5.15 cm/d from June to July. The moisture content was 55.20% ~ 80.54%. The crude protein content (CP) based on dry matter was 7.50% ~ 10.76%, the crude fiber (CF) was 31.50% ~ 42.90%, and the neutral detergent fiber (NDF) was 63.00% ~ 74.40%, acid detergent fiber (ADF) was 35.40% ~ 44.60%, and crude ash (Ash) was 6.40% ~ 11.20%. But the contents of crude fat (EE), Ca and P were low. [Conclusion] The yield of bamao grass was rich and its nutritional value was higher than that of general crop straw, which indicated that bamao grass could be popularized as roughage for beef cattle.

Key words: bamao grass; output; plant height; growth rate; conventional nutrients